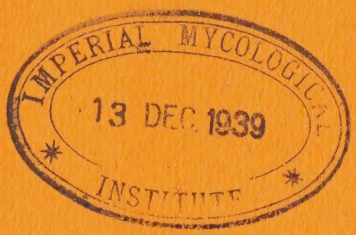
R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

134



G. LUCHETTI

SUI RAPPORTI TRA SVILUPPO DI APICULATI E FORMAZIONE DI ACIDITÀ VOLATILE NELLA FERMENTAZIONE VINARIA.

Estratto dal *Bollettino della Facoltà di Agraria*
Vol. XII - 1936 - XV

PREMIATO STABILIMENTO TIPOGRAFICO G. CURSI & FIGLI - 1936 XV

G. LUCHETTI

SUI RAPPORTI TRA SVILUPPO DI APICULATI E FORMAZIONE DI ACIDITÀ VOLATILE NELLA FERMENTAZIONE VINARIA.

RIASSUNTO: *L'A. ha voluto, con le ricerche di cui riferisce, portare un modesto contributo allo studio sulla identificazione degli agenti produttori di acidi volatili nella fermentazione vinaria e, con prove su mosti fermentanti naturalmente in grandi masse, é riuscito a stabilire che esiste un rapporto di proporzionalità inversa tra numero di cellule di lieviti apiculati in confronto al numero di cellule di ellittici ed incremento di formazione di acidi volatili.*

L'argomento che ci siamo proposti di studiare nel corso delle brevi esperienze su cui riferiamo non è nuovo nella bibliografia scientifica; esistono anzi, al riguardo, oltre ad un lavoro di PULSELLI (1), due particolareggiati studi di DE ROSSI (2) ai quali rimandiamo senz'altro per le conoscenze sull'argomento.

Nostro intendimento era quello di studiare quali rapporti intercorrano fra lo sviluppo dei lieviti apiculati e la formazione di acidità volatile in fermentazioni vinarie normali, compiute, cioè, con le modalità e le finalità più generalmente in uso, confrontandole però anche con fermentazioni "*in vitro*„ in condizioni del tutto artificiali.

Per far ciò eseguimmo un certo numero di esperienze sia su mosto fermentante entro grandi botti che su mosto posto a fermentare in piccoli recipienti.

Giornalmente sui mosti in esame eseguimmo le seguenti ricerche:

---

(1) PULSELLI A. – *Studio sui fermenti alcoolici dei mosti dell'Umbria.* Nuovi Annali di Agric. – Anno IV, pag. 530. Roma, 1927.

(2) DE ROSSI G. – *I lieviti apiculati nella fermentazione vinaria.* Staz. Sper. Agr. Ital. Vol. 53, pag. 233. Modena, 1920.

— *I lieviti della fermentazione vinaria nella Regione Umbra.* Congr. d. vigna e d. Vino. Lausanne, 1935.

A – Acidità totale.
B – Acidità volatile.
C – Acidità fissa.
D – Gradazione alcoolica.
E – Rapporto fra lieviti a tipo ellittico e lieviti a tipo apiculato.

Diamo un rapido cenno sui procedimenti adottati per le varie ricerche.

A – *Ricerca dell' acidità totale :* titolammo il mosto con soluzioni di KOH N/10, in presenza di fenolftaleina, trattandosi sempre di mosti di uve bianche. Esprimiamo sempre il tenore di acidità totale in grammi di acido tartarico per cc. 100 di mosto.

B – *Ricerca dell'acidità volatile* : eseguimmo tale ricerca con il metodo ufficiale in uso nei Laboratori italiani, cioè mediante distillazione in corrente di vapore e titolazione del distillato con soluzione di KOH N/10 in presenza di fenolftaleina. La esprimiamo in grammi di acido acetico per cc. 100 di mosto.

C – *Ricerca dell' acidità fissa :* determinammo l' acidità fissa per differenza tra l' acidità totale e l' acidità volatile, ambedue calcolate in acido tartarico e la riportiamo sempre in grammi di acido tartarico per cc. 100 di mosto.

D – *Gradazione alcoolica :* la ottenemmo dal peso specifico del distillato.

E – *Rapporto fra lieviti a tipo ellittico e lieviti a tipo apiculato.* Trovammo tale rapporto mediante osservazioni microscopiche su preparati a fresco con contaglobuli Thoma-Zeiss. Sui particolari di questa ricerca ci soffermiamo alquanto, per esser più chiari nella descrizione del metodo seguito. Esso consisteva nel prelevare un campione di mosto che rispecchiasse quanto più possibile le condizioni medie della massa in esame e nell' eseguire con aliquote di detto campione un certo numero di preparati sul contaglobuli (il numero di preparati non era mai inferiore ad 8-10 per ciascuna determinazione). Con l'esame microscopico di detti preparati determinavamo il numero di cellule rispondenti nettamente al tipo ellittico ed a parte il numero di quelle rispondenti nettamente al tipo apiculato, escludendo dalla numerazione tutti quegli elementi cellulari a caratteri incerti e cioè, che per la posizione rispetto all'asse ottico dello strumento o per appartenere a

specie diverse da quella di cui ci occupavamo o per la loro età non si sarebbero potuti ascrivere a prima vista e con assoluta certezza ad uno dei gruppi suddetti. Con ciò non pretendiamo di aver ottenuto risultati esattissimi; ma siamo convinti che essi rispondono alla approssimazione richiesta dall' indole dello studio propostoci. Di ciò ci assicura anche la larghezza con cui eseguimmo le ricerche, avendo per ciascuna determinazione portato l' indagine su un elevato numero di cellule, generalmente superiore a 2000, anche se ciò richiedeva un lavoro notevole.

Dalla curva di variabilità del rapporto fra i due tipi di fermenti, messa in confronto con quella di aumento dell' acidità volatile, è possibile di dedurre quanta parte di questa sia dovuta all' attività degli apiculati, ai quali dalla maggioranza degli sperimentatori si attribuisce spiccata attitudine alla produzione di acidi volatili.

Le ricerche sul grado alcoolico, sulla acidità totale e su quella fissa, che non hanno stretto rapporto con il tema principale dello studio, hanno carattere complementare, atto a stabilire come variano dette produzioni con il variare del predominio della specie fermentante.

Passiamo ora alla descrizione delle esperienze.

Esperienza I

Per questa esperienza orientativa ci procurammo uva bianca, sana e ben matura che pigiammo e ponemmo a fermentare in un recipiente di vetro della capacità di circa 1. 8, riempito per 2/3 dell' altezza. Nel recipiente ponemmo anche le vinacce ma non i graspi.

Ad ogni 12 ore, a partire dal momento della pigiatura, determinammo l' acidità totale del mosto per seguirne le variazioni con una certa esattezza.

Dall' inizio della fermentazione in poi eseguimmo su detto mosto le analisi e le ricerche di cui sopra, ad intervalli di 24 ore. L' inizio della fermentazione si verificò dopo due giorni e mezzo dalla pigiatura, con evidente ritardo imputabile in parte ad un abbassamento della temperatura ambiente verificatosi nelle prime ore dopo la pigiatura, in parte a cause imprecisabili.

Per questa ragione e per il fatto che dopo quattro giorni e mezzo circa di

fermentazione lentissima incominciarono a svilupparsi fermenti acetici l'andamento del processo non può assolutamente ritenersi normale ed è perciò che riferiamo solo sui dati raccolti fino alla 132ª ora, fino a che, cioè, essi dati non furono falsati dallo sviluppo di microrganismi dannosi.

TABELLA I — Esperienza I — (Valori % di mosto)

Dopo ore	Acidità			Alcool	Rapporto lieviti ellittici / lieviti apiculati
	Totale (ac. tartarico) gr.	Fissa (ac. tartarico) gr.	Volatile (ac. acetico) gr.		
Iniz.	0,6225	0,6096	0,0103	—	0,25
12	0,5868	—	—	—	—
24	0,5544	—	—	—	—
36	0,5220	—	—	—	—
48	0,5184	—	—	—	—
60	0,5112	0,4867	0,0196	—	0,72
84	0,4860	0,4600	0,0208	tracce	0,88
108	0,6772	0,6506	0,0213	0,50	0,97
132	0,7278	0,6997	0,0225	0,90	2,50

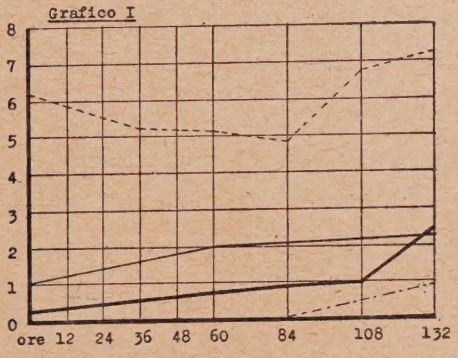
In questo come nei seguenti grafici indichiamo con:

— — — — — — l' acidità totale

——————— „ volatile

—·—·—·—·—·— l' alcool

▬▬▬▬▬▬ il rapporto $\frac{\text{lieviti ellittici}}{\text{lieviti apiculali}}$



Prima di parlare dettagliatamente dei risultati di questa esperienza passiamo a descrivere l' esperienza seguente che, come già abbiamo accennato, ha con questa punti di contatto.

Esperienza II

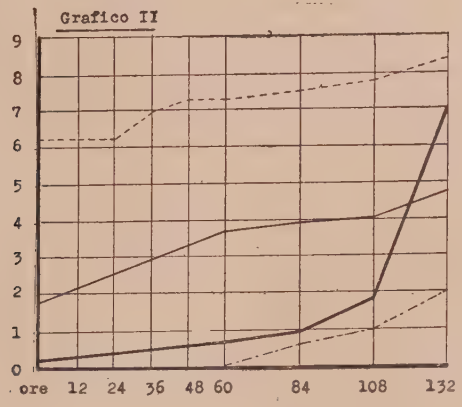
Unica differenza tra questa e la precedente esperienza è quella di aver proceduto, questa volta, alla vinificazione in assenza di vinaccie. Come abbiamo già detto non possiamo esporre i risultati ottenuti oltre la 132ª ora perchè non riferibili a fermentazione vinaria normale sibbene alla sovrapposizione della fermentazione acetica a quella alcoolica. Fino alla 132ª ora, però, e forse anche fino alla 156ª (i cui risultati omettiamo per misura di prudenza), nessun indizio rivelò la fermentazione acetica e possiamo quindi esser certi dei risultati ottenuti che esponiamo nella tabella II e nel grafico II.

TABELLA II — Esperienza II — (Valori % di mosto)

Dopo ore	Acidità			Alcool	Rapporto lieviti ellittici / lieviti apiculati
	Totale (ac. tartarico) gr.	Fissa (ac. tartarico) gr.	Volatite (ac. acetico) gr.		
Iniz.	0,6225	0,6006	0,0175	—	0,20
12	0,6264	—	—	—	—
24	0,6264	—	—	—	—
26	0,6984	—	—	—	—
48	0,7308	—	—	—	—
60	0,7308	0,6847	0,0369	tracce	0,70
84	0,7492	0,7002	0,0392	0,60	0,94
108	0,7780	0,7277	0,0404	1,00	1,82
132	0,8388	0,7791	0,0477	2,04	6,90

I risultati delle due esperienze delle quali abbiamo riferito non sono invero molto concordanti, sebbene tra loro non in antitesi. Dall' esame dei risultati stessi, infatti, rileviamo che, pur essendosi avuto predominio dei lieviti apiculati fino alla 108ª ora nella prima esperienza e solo fino alla 84ª ora nella seconda, la produzione di acidità volatile è stata molto maggiore nella seconda esperienza come appare chiaramente dall' esame delle due curve nei rispettivi grafici

Ad ogni modo, una analogia c' è fra i risultati delle due prove, consistente nel fatto che la produzione più forte di acidi volatili si è avuta precisamente nelle prime ore dello sviluppo dei lieviti, e finchè i lieviti apiculati presentavano



una più forte prevalenza su quelli ellittici. Ciò conferma i risultati pubblicati nel 1920 da De Rossi, secondo i quali colture pure di apiculati in mosto d' uva sarebbero capaci di produrre acidi volatili in quantità fino a quattro volte superiori a quelle di colture miste di ellittici ed apiculati nelle stesse condizioni di ambiente.

Da notare, in queste due prove preliminari, la variazione della acidità totale, contraria a quella che ci si dovrebbe logicamente attendere : diminuisce fino all' 84ª ora quella del mosto fermentante in presenza di vinaccie (esp. I) mentre aumenta per tutta la durata dell' esperienza quella del mosto fermentante in bianco. A cosa si debba attribuire il fenomeno non è facile stabilire, nè azzardiamo ipotesi al riguardo, data anche l' anomalia generale delle due fermentazioni. Passiamo quindi senz' altro alla descrizione delle successive esperienze.

Esperienza III

Questa e la seguente esperienza hanno un carattere più pratico delle pre-

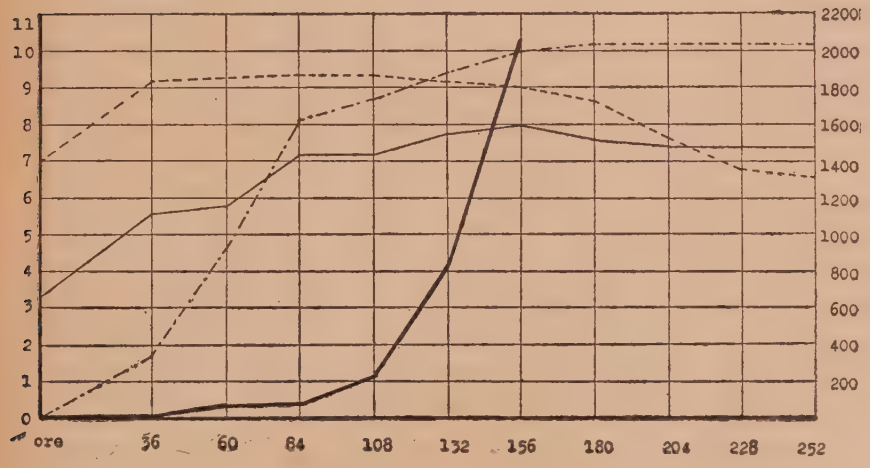
cedenti in quanto, invece che a piccole quantità di mosto fermentanti " in vitro „ si riferiscono a grandi masse di materiale in fermentazione perfettamente normale. Le ricerche su cui passiamo a riferire e che conducemmo quasi parallelamente sono da riportarsi alla vinificazione di uve bianche raccolte nella vendemmia 1935 a Corridonia (Macerata-Marche). Per essere più precisi diciamo che il mosto proveniente da dette uve fu messo a fermentare in grandi botti (non tini) di

TABELLA III — Esperienza III — (Valori % di mosto)

Dopo ore	Acidità			Alcool	Rapporto lieviti ellitici / lieviti apiculati
	Totale (ac. tartarico) gr.	Fissa (ac. tartarico) gr.	Volatile (ac. acetico) gr.		
Iniz.	0,7002	0,6581	0,0337	0,00	1,00
36	0,9173	0,8474	0,0559	1,75	20,00
60	0,9275	0,8530	0,0580	5,63	50,00
84	0,9338	0,8442	0,0717	8,10	83,00
108	0,9338	0,8442	0,0717	8,70	234,00
132	0,9173	0,8209	0,0711	9,40	838,00
156	0,9008	0,8005	0,0802	10,00	2072,00
180	0,8647	0,7697	0,0760	10,22	∞
204	0,7641	0,6718	0,0738	10,22	∞
228	0,6839	0,5916	0,0738	10,22	∞
252	0,6587	0,5664	0,0738	10,22	∞

legno di castagno, della capacità di l. 10.000 circa, riempite per poco più di 2/3. La vinificazione avveniva in presenza di vinaccie e graspi, ed avvenendo in botte non ne era certo possibile la follatura ciò che però non porta ad inconvenienti,

Grafico III



secondo insegna anche una lunga pratica degli agricoltori del luogo, perchè data la conformazione del recipiente e la saturazione con CO_2 dell' ambiente sovrastante al " cappello „ si impedisce in modo quasi assoluto il contatto di questo con l' ossigeno dell' aria.

Per le analisi prelevavamo il mosto dalle botti a mezzo di tre robinetti, posti rispettivamente in alto, in mezzo ed in basso della massa fermentante, spillandone quantità all' incirca uguali da ciascuno di essi in modo da avere un campione rispecchiante le condizioni medie della massa ed escludendo dall' esame le prime parti di liquido spillato per avere anche una specie di lavaggio dei robinetti con il liquido da analizzare.

Eseguimmo il primo prelevamento, per l' analisi iniziale del mosto, appena avvenuta la pigiatura dell' uva, ciè circa alle ore 19 del 5 ottobre 1935 ; conservammo il campione stesso in ghiacciaia fino al mattino seguente per l' analisi

ed attendemmo fino al mattino del 7 ottobre prima di fare il secondo prelevamento, in modo da poter ultimare le ricerche sul liquido iniziale e da portare i successivi prelevamenti ad un' ora del giorno tale che ci permettesse d'iniziare ed ultimare le ricerche nel più breve tempo possibile senza ricorrere ogni volta alla conservazione in ghiacciaia. I risultati ottenuti nella esperienza III esponiamo nella tabella III e nel grafico III.

Nei grafici III e IV le scale di sinistra si riferiscono all' acidità e quelle di destra al rapporto fra i due tipi di lieviti.

Esperienza IV

Questa esperienza è in tutto analoga alla precedente di cui non è se non una conferma. Quindi vale per essa ciò che abbiamo premesso alla descrizione della precedente; unica differenza, se pur non sostanziale, fra le due prove, è la differente capacità della botte di fermentazione che mentre era, come già abbiamo detto di l. 10.000 nel primo caso, era invece di l. 3.000 nel secondo.

Nel corso del processo di fermentazione delle due botti sotto studio osservammo che nella seconda la fermentazione si iniziò con alcune ore di anticipo rispetto alla prima, ciò che si può attribuire a due fatti: la capacità minore della botte ed un leggero aumento della temperatura ambiente dovuto alla contemporanea presenza di varie botti in fermentazione tumultuosa nello stesso locale durante la fermentazione del mosto di cui alla presente esperienza, iniziata un paio di giorni dopo la precedente. Anche la fine della fermentazione tumultuosa si verificò questa volta con maggiore rapidità, tanto che il mosto di cui all' esperienza precedente fu svinato dopo 140 ore, questo invece solo dopo 100 ore. Inutile dire che i prelevamenti eseguiti dopo la svinatura furono fatti dalle botti in cui erano stati travasati i rispettivi mosti, sempre seguendo le norme di cui sopra.

Nella tabella IV e nel grafico IV riportiamo i valori ottenuti dalle analisi relative a questa esperienza.

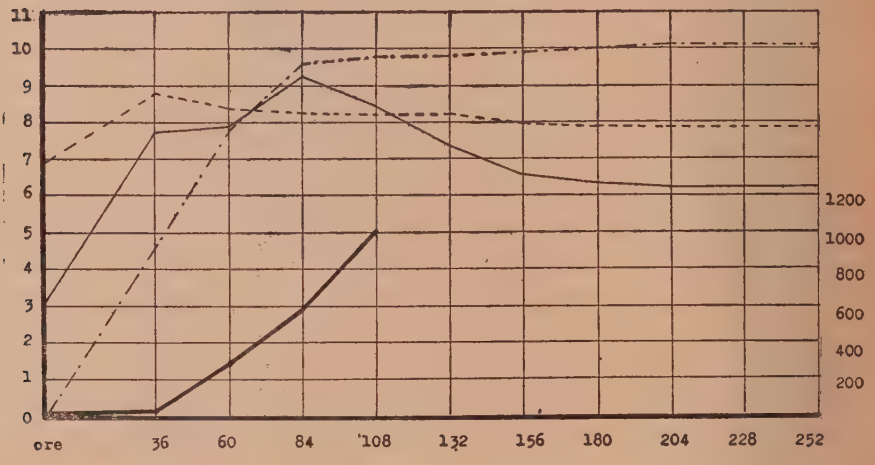
TABELLA IV — Esperienza IV — (Valori % di mosto)

Dopo ore	Acidità			Alcool	Rapporto lieviti ellittici / lieviti apiculati
	Totale (ac. tartarico) gr.	Fissa (ac. tartarico) gr.	Volatile (ac. acetico) gr.		
Iniz.	0,6923	0,6257	0,0316	—	1,52
36	0,8775	0,7811	0,0771	4,61	34,00
60	0,8368	0,7379	0,0791	7,84	285,00
84	0,8286	0,7126	0,0928	9,60	587,00
108	0,8248	0,7193	0,0844	9,60	1012,00
132	0,8224	0,7201	0,0738	9,80	∞
156	0,7962	0,7144	0,0654	9,94	∞
180	0,7903	0,7114	0,0631	10,00	∞
204	0,7877	0,7102	0,0620	10,10	∞
228	0,7877	0,7102	0,0620	10,10	∞
252	0,7877	0,7102	0,0620	10,10	∞

Come si vede, i risultati delle due ultime prove concordano al punto da non lasciare dubbi sull'attitudine dei lieviti apiculati a produrre acidità volatile: ci si accorge infatti facilmente che l'acidità volatile è cresciuta rapidamente nei due mosti fino a che il numero dei lieviti ellittici non ha superato di molto quello degli apiculati; più tardi, invece, quando il numero di questi è diventato molto

piccolo rispetto a quello dei primi, e quindi si è ridotta talmente la loro attività da tendere a zero, la produzione di acidi volatili non solo è rallentata, ma si è arrestata ed anzi si è avuta costantemente una diminuzione di tali composti.

Grafico IV



CONCLUSIONI

Dalle esperienze di cui sopra e nelle particolari condizioni di esperimento risulta quanto segue:

I – Nei mosti d'uva, subito dopo la pigiatura, esiste un numero di lieviti apiculati che può uguagliare ed anche superare di molto quello degli ellittici.

II – Il numero di cellule degli apiculati rispetto a quello di cellule degli ellittici va in ogni caso diminuendo col tempo e col progredire del processo fermentativo, tanto più velocemente quanto più avanza il processo stesso, ed anche se per qualche causa resti ostacolata la fermentazione normale; e tanto più velocemente quanto più è rapido l'inizio della fermentazione tumultuosa. A questo proposito si potrebbe quasi affermare che esista un rapporto di proporzionalità

diretta fra rapidità di fermentazione e decremento del numero di cellule apiculate rispetto alle ellittiche.

III – La formazione di acidi volatili nei mosti in fermentazione è maggiore all'inizio del processo, finchè il rapporto $\frac{\text{liev. ellittici}}{\text{liev. apiculati}}$ non ha assunto valori forti. In altri termini si ha forte produzione di acidi volatili fino a che l'attività dei lieviti apiculati non è contrastata ed ostacolata da quella dei lieviti ellittici, ciò che induce a credere che tali composti siano prodotti, in fermentazioni normali a cui non prendano parte attiva tipici acidificanti, quasi esclusivamente dai fermenti apiculati. Tale supposizione è avvalorata, oltrechè dai risultati ottenuti da altri Autori, anche dal fatto che noi abbiamo potuto constatare un regresso nella quantità di acidi volatili presenti nel mosto dopo la fine della attività dei lieviti apiculati. Questo fenomeno è difficile a spiegarsi. Si può trovare la ragione o nel fatto che i lieviti ellittici od altri microrganismi presenti nel liquido fermentante demoliscano in parte gli acidi volatili, oppure che si verifichi una parziale eterificazione di tali composti. Comunque ambedue le ipotesi avrebbero bisogno di conferme sperimentali.

IV – La presenza e l'attività dei lieviti apiculati, secondo i risultati delle nostre ricerche, è limitata alla sola fase della fermentazione tumultuosa. Infatti, il loro numero alla fine di questa è limitatissimo rispetto a quello degli ellittici.

Pisa, Facoltà di Agraria della R. Università
Istituto di Patologia vegetale e Microbiologia agraria

(Presentata il 17 novembre – XV)